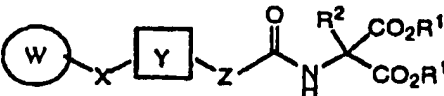
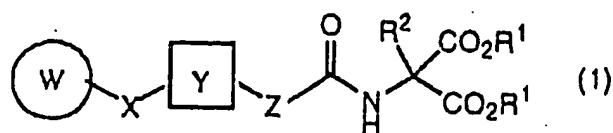




<p>(51) 国際特許分類6 C07C 235/20, 227/06, 229/24, 231/02, C07D 213/38, 215/38, 235/30, 239/42, 239/47, 239/48, 239/94, 277/42, 277/44, 277/68, 277/82, 333/54, 417/12, A61K 31/225, 31/38, 31/415, 31/425, 31/44, 31/47, 31/505</p>	A1	<p>(11) 国際公開番号 WO00/15604</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月23日(23.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04914</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月10日(10.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/258840 1998年9月11日(11.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 杏林製薬株式会社 (KYORIN PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2丁目5番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 河野靖志(KONO, Yasushi)(JP/JP) 〒323-0820 栃木県小山市西城南5-30-8 Tochigi, (JP) 野村昌弘(NOMURA, Masahiro)(JP/JP) 〒329-0101 栃木県下都賀郡野木町友沼6095 B203 Tochigi, (JP) 澤田孝之(SAWADA, Takayuki)(JP/JP) 〒331-0043 埼玉県大宮市大成町3丁目510番地5 Saitama, (JP) 安藤尚基(ANDO, Naoki)(JP/JP) 〒329-0101 栃木県下都賀郡野木町友沼5932 B202 Tochigi, (JP) 高橋雪絵(TAKAHASHI, Yukie)(JP/JP) 〒329-0101 栃木県下都賀郡野木町友沼5982-1 Tochigi, (JP)</p>	<p>栗山和彦(KURIYAMA, Kazuhiko)(JP/JP) 〒329-0214 栃木県小山市乙女1-7-16 Tochigi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 笑浦 清(MINOURA, Kiyoshi) 〒102-0073 東京都千代田区九段北3丁目2番2号 九段ビル7階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: MALONIC DIESTER DERIVATIVES AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME</p> <p>(54) 発明の名称 マロン酸ジエステル誘導体及びその製造法</p> <div style="text-align: center;">  <p>(1)</p> </div> <p>(57) Abstract Malonic diesters derivatives represented by general formula (1) and pharmacologically acceptable salts thereof being capable of preventing ICAM-1 and VCAM-1, which play the major roles among cell adhesion molecules, from binding to leukocytes; and cell adhesion inhibitors containing as the active ingredient at least one of the above compounds and serving as excellent immunosuppressants, anti-inflammatory agents, antiallergic agents and tumor metastasis inhibitors.</p>		

本発明は細胞接着分子の中でも中心的役割をなす ICAM-1、VCAM-1 と白血球との結合を阻害する物質を提供することによって、優れた免疫抑制剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、癌転移抑制剤を提供することにより、一般式 (1)



で表されるマロン酸ジエステル誘導体及び薬理学的に許容しうる塩及びこれらの少なくとも一種類以上を有効成分とする細胞接着抑制剤である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	DE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	EE スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レント	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	ML モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MN モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MR マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明 細 書

## マロン酸ジエステル誘導体及びその製造法

## 技術分野

本発明は、細胞接着分子間の結合阻害活性を有し、免疫抑制剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、癌転移抑制剤として有用なマロン酸ジエステル誘導体及びそれらの製造法に関する。

## 背景技術

免疫反応や炎症反応において、血管内皮細胞と白血球との接着は極めて重要な過程をしめている（Mebio, No.5, Vol.10, (1993)）。この接着に関与する血管内皮細胞側の主な接着分子には、I C A M-1、V C A M-1、E-セレクチン、P-セレクチンなどが報告されており、各接着分子の発現は炎症が惹起されてからの時間によって異なっている（診断と治療、83巻、1164、（1995）、Springer Semin Immunopathol, Vol.11 163, (1989), Cell, Vol.76, 301 (1994)）。即ち、炎症が惹起されてから5～30分後（即時）に発現のピークを示し以後発現が低下するものとしてP-セレクチンが、また2～6時間（早期）で発現のピークを示し以後発現が低下するものとしてはE-セレクチンが、さらに12～48時間後（晩期）に発現のピークを示すものとしてI C A M-1、V C A M-1がある。なかでも晩期に多量に発現するI C A M-1、V C A M-1を介した白血球との接着は最も強固であり、実際の各種疾患においても、これら2つの接着分子が重要な役割を果たしているとされている。従って、炎症時に中心的役割をなすI C A M-1、V C A M-1といった接着分子を介した接着を阻害することができれば、慢性

関節リウマチ、腎炎、変形性膝関節炎などの自己免疫疾患や慢性炎症性疾患、喘息、皮膚炎などのアレルギー疾患の治療薬、癌転移抑制剤として有効であると考えられる。

現在までに報告されている細胞接着阻害剤は、接着分子の発現を抑制することにより接着を阻害するいわゆる発現抑制剤と、接着分子間の結合を阻害することによって接着を阻害するいわゆる結合阻害剤とに分類される。I C A M-1 や V C A M-1 に関する細胞接着抑制剤のほとんどは発現抑制剤であり(特開平9-110689、特開平8-283156、特開平8-198752、特開平7-304667、特開平7-258168)、結合阻害剤については、接着分子の抗体やリガンドのようなペプチド性巨大分子を除けば、唯一 J. Med. Chem., Vol.38, 1057 (1995) に非ペプチド性低分子化合物が報告されているにすぎない。発現抑制剤は、細胞内情報伝達系に対して作用を示すことが多く、接着分子発現以外の機能も抑制してしまうことが考えられる。このような発現抑制剤とは異なり、結合阻害剤は接着分子間の結合のみを阻害することから、安全性においても優れた薬物になりうると考えられるが、いまだ満足できるものではない。

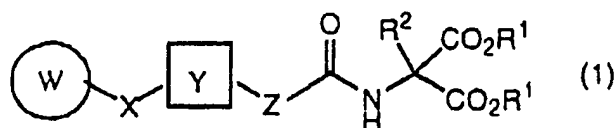
本発明は、細胞接着分子の中でも中心的役割をなす I C A M-1、V C A M-1 と白血球との結合を阻害する物質を提供することによって、優れた免疫抑制剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、癌転移抑制剤を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者らは、ヒト単球様細胞株 (U937) と I L-1 $\beta$  刺激 24 時間後のヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (H U V E C) との結合を阻害する化合物について鋭意研究を重ねた結果、これまでに知

られている細胞接着阻害剤とは構造を異にした新規なマロン酸ジエステル誘導体が、接着分子の発現抑制作用を示すことなく ICAM-1、VCAM-1 を介した細胞間の結合を阻害することを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は一般式 (1)

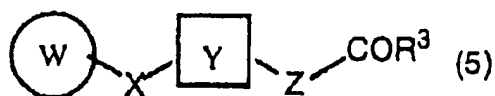


[式中、Wは置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいキノリン環、置換されていてもよいベンゾチアゾール環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいキナゾリン環、置換されていてもよいチエノピリミジン環、置換されていてもよいベンズイミダゾール環を、Xはアミノ基、 $-\text{CONH}-$ を、Yは置換されていてもよいベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、クロマン環、1,3-チアゾール環を、Zは $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$  ( $n$ は0～3の整数)を、 $\text{R}^1$ は炭素数1～4の低級アルキル基を、 $\text{R}^2$ は水素原子、炭素数1～4の低級アルキル基、炭素数1～4の低級アルコキシカルボニル基を示す]で表されることを特徴とするマロン酸ジエステル誘導体及び薬理学的に許容しうる塩、並びにそれらの少なくとも一種類以上を有効成分とする細胞接着抑制剤である。

本発明における一般式 (1) で表される化合物の薬理学的に許容される塩には、塩酸塩、臭化水素酸塩、メタンスルホン酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩のような酸付加塩が挙げられる。

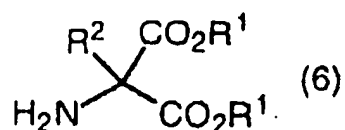
また、本発明の一般式（１）において、低級アルキル基、低級アルコキシカルボニル基等の「低級アルキル基」とは、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル等の直鎖もしくは分岐した炭素数１～４の炭化水素を表し、「置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいキノリン環、置換されていてもよいベンゾチアゾール環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいキナゾリン環、置換されていてもよいチエノピリミジン環、置換されていてもよいベンズイミダゾール環」とは、環上の任意の位置に低級アルキル基、低級アルコキシ基、トリフルオロメチル基、メトキシメチル基、Cl、Br、I、F等のハロゲン原子、ニトロ基、アセチル基、アセチルアミノ基等の低級アシルアミノ基、ピペリジン基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基等の低級ジアルキルアミノ基を有するものが挙げられる。

本発明によれば、上記一般式（１）で表される化合物は、一般式（５）



[式中、Wは置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいキノリン環、置換されていてもよいベンゾチアゾール環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいキナゾリン環、置換されていてもよいチエノピリミジン環、置換されていてもよいベンズイミダゾール環を、Xはアミノ基、 $-\text{CONH}-$ を、Yは置換されていてもよいベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、クロマン環、1,3-チアゾール環

を、Zは $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$  ( $n$ は0～3の整数)を、 $\text{R}^3$ はヒドロキシ基、ハロゲン原子を示す]で表される化合物と一般式(6)で表される化合物を縮合させることによって製造することができる。

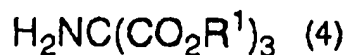


[式中、 $\text{R}^1$ は炭素数1～4の低級アルキル基を、 $\text{R}^2$ は水素原子、炭素数1～4の低級アルキル基、炭素数1～4の低級アルコキシカルボニル基を示す]

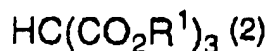
反応は、式(5)の $\text{R}^3$ がハロゲン原子である酸ハライドの場合、トリエチルアミン、ピリジン等の有機塩基の存在下に塩化メチレン、1,4-ジオキサン等を溶媒として用い、0℃～室温下に行うことができる。また、式(5)の $\text{R}^3$ がヒドロキシ基の場合、通常のペプチド結合形成反応に用いられる混合酸無水物法や活性エステル法によって製造することができ、好ましくは縮合剤を用いる方法が適している。反応は、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、ジフェニルホスホニルアジド(DPPA)、ジエチルホスホニルシアニド(DEPC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(WSC)等の縮合剤の存在下、場合によっては、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)を触媒として加え、反応溶媒としてはテトラヒドロフラン(THF)、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド(DMSO)、好ましくはジメチルホルムアミド(DMF)等

を用い、反応温度としては 0℃～室温下に行うことができる。

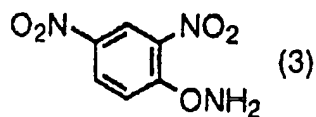
上記一般式 (6) で  $R^2$  が炭素数 1～4 の低級アルコキシカルボニル基である化合物、即ち一般式 (4)



[式中、 $R^1$  は前述の通り] で表される化合物は、一般式 (2) で表される化合物と式 (3) で表される化合物を反応させることによって製造することができる。



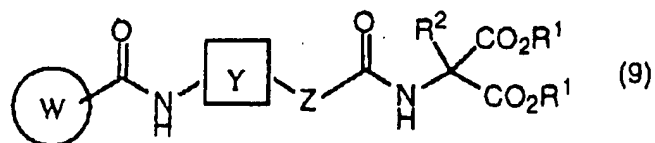
[式中、 $R^1$  は前述の通り]



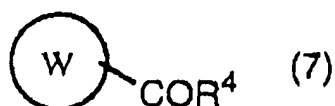
反応は、DMF、1,4-ジオキサン、THF等を溶媒として用い、カリウムt-ブトキシド、ナトリウムアルコキシド、水素化ナトリウム等の塩基の存在下、0℃～室温下に行うことができる。

上記一般式 (1) で、Xが-CONH-である化合物、即ち一般式 (9)

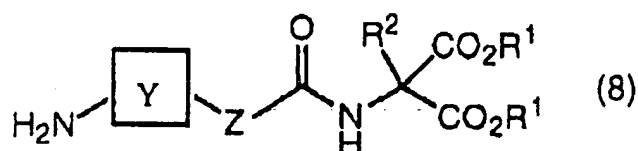




[式中、W、Y、Z、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は前述の通り]で表される化合物は、一般式(7)で表される化合物と一般式(8)で表される化合物を縮合させることによって製造できる。



[式中、R<sup>4</sup>はヒドロキシ基、ハロゲン原子を示し、Wは前述の通り]



[Y、Z、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は前述の通り]

反応は、式(7)のR<sup>4</sup>がハロゲン原子である酸ハライドの場合、トリエチルアミン、ピリジン等の有機塩基の存在下に塩化メチレン、1,4-ジオキサン等を溶媒として用い、0℃～室温下に行うことができる。また、式(7)のR<sup>4</sup>がヒドロキシ基の場合、通常のペプチド結合形成反応に用いられる混合酸無水物法や活性エステル法によって製造することができ、好ましくは縮合剤を用いる方法が適している。反応は、DCC、DIPC、DPPA、DEPC、WS

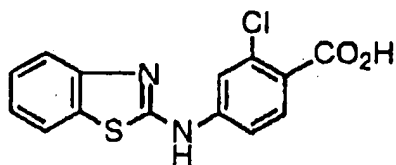
C等の縮合剤の存在下、場合によっては、DMA Pを触媒として加え、反応溶媒としてはTH F、塩化メチレン、DMS O、DM Fを用い、反応温度としては0℃～室温下に行うことができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を具体例によって説明するが、これらの例によって本発明が限定されるものではない。

#### 参考例 1

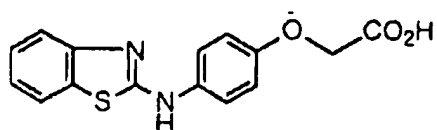
4-（ベンゾチアゾール-2-イル）アミノ-2-クロロ安息香酸



2-クロロベンゾチアゾール (2.12g)、4-アミノ-2-クロロ安息香酸エチル (2.50g) の混合物を 140℃にて 30分加熱攪拌した。冷後反応物をエタノールに溶解し、水を加え析出した結晶をろ取した。4-（ベンゾチアゾール-2-イル）アミノ-2-クロロ安息香酸エチルエステル (3.78g) を淡黄色粉末として得た。得られたエステル (1.28g) をエタノール (20ml) に溶解し、10%水酸化ナトリウム水溶液 (5ml) を加え、1時間加熱環流した。冷後エタノールを減圧留去し、残渣に水を加えた後、反応液を希塩酸で pH 3とし析出した結晶をろ取した。水洗、乾燥後、目的物 (1.05g) を無色粉末として得た。

参考例 2

4 - [ (ベンゾチアゾール-2-イル) アミノ ] フェニルオキシ酢酸



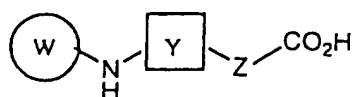
2-クロロベンゾチアゾール (19.2g) とパラアミノフェニルオキシ酢酸エチル (22.0g) の 1、3-ジメチル-2-イミダゾリジノン (300ml) 溶液に、ピリジニウムパラトルエンスルホン酸 (2.83g) を加え、140℃にて2時間攪拌した。反応液に水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 n-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) で精製し得られた結晶をメタノールで洗浄し、4-[(ベンゾチアゾール-2-イル) アミノ] フェニルオキシ酢酸エチル (21.5g) を無色粉末として得た。得られたエステルを参考例 1 と同様にアルカリ加水分解し、目的物を無色粉末として得た。

参考例 3 ~ 6 1

参考例 1 または 2 と同様に行い、表 1 に示す化合物を合成した。

表 1

10

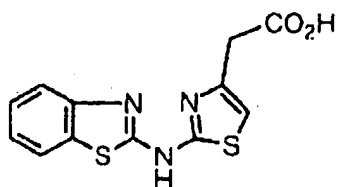


参考例	W	Y	Z	参考例	W	Y	Z
3			—	20			-OCMe <sub>2</sub> -
4			-CH <sub>2</sub> -	21			-OCH <sub>2</sub> -
5				22			-OCH <sub>2</sub> -
6			-NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	23			-OCH <sub>2</sub> -
7			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	24			-OCMe <sub>2</sub> -
8			(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	25			-OCH <sub>2</sub> -
9			CH <sub>2</sub>	26			-OCH <sub>2</sub> -
10			CH <sub>2</sub>	27			-OCH <sub>2</sub> -
11			CH <sub>2</sub>	28			-OCH <sub>2</sub> -
12			CH <sub>2</sub>	29			-OCH <sub>2</sub> -
13			CH <sub>2</sub>	30			-OCH <sub>2</sub> -
14			CH <sub>2</sub>	31			—
15			-OCH <sub>2</sub> -	32			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
16			-OCH <sub>2</sub> -	33			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
17			-OCH <sub>2</sub> -	34			-OCH <sub>2</sub> -
18			-OCH <sub>2</sub> -	35			-OCH <sub>2</sub> -
19			-OCH <sub>2</sub> -	36			

参考例	W	Y	Z	参考例	W	Y	Z
37			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	50			
38			-OCH <sub>2</sub> -	51			
39			-OCH <sub>2</sub> -	52			-OCH <sub>2</sub> -
40			-OCH <sub>2</sub> -	53			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
41			-OCMe <sub>2</sub> -	54			
42			-OCH <sub>2</sub> -	55			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
43			-OCH <sub>2</sub> -	56			-OCH <sub>2</sub> -
44			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	57			-OCH <sub>2</sub> -
45			-OCH <sub>2</sub> -	58			-OCH <sub>2</sub> -
46			-OCH <sub>2</sub> -	59			-OCH <sub>2</sub> -
47			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	60			-OCH <sub>2</sub> -
48				61			-OCH <sub>2</sub> -
49			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>				

参考例 6 2

[ 2 - (ベンゾチアゾール-2-イル) アミノ-1,3-チアゾール-4 ]酢酸



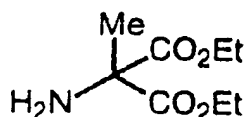
チオシアン酸アンモニウム (9.09g) の T H F (200ml) 溶液に室温攪拌下、ベンゾイルクロライド (14.5g) を加え、その後 10 分間加熱還流した (ベンゾイルイソチオシアネートの調製)。反応液に 2-アミノベンゾチアゾール (13.6g) を加え、さらに 3 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去し、残渣に水を加え析出した結晶をろ取した。結晶を熱エタノールで洗浄し、N-ベンゾイル-N'-(ベンゾチアゾール-2-イル) チオ尿素 (17.5g) を淡黄色粉末として得た。得られたチオウレア (17.5g)、水酸化リチウム 1 水和物

(6.03g) を水 (200ml) に溶解し、20 分間加熱還流した。冷後、反応液に希塩酸を加え pH 1 とし、ついでアンモニア水で pH 10 とし水浴上で可温後放冷した。析出した結晶をろ取し、T H F-イソプロピルエーテルより再結晶した。N-(ベンゾチアゾール-2-イル) チオ尿素 (3.62g) を無色針状晶として得た。得られた結晶 (1.72g) を T H F (50ml) に溶解し、4-クロロアセト酢酸エチル (6.30g)、D M A P (0.12g) を加え、20 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去し、残渣にイソプロピルエーテルを加え析出した結晶をろ取し、[ 2 - (ベンゾチアゾール-2-イル) アミノ-1,3-チアゾール-4 ]酢酸エチル塩酸塩 (2.69g) を淡褐色粉末として

得た。得られたエステル体を参考例 1 及び 2 と同様アルカリ加水分解し目的物を無色粉末として得た。

### 参考例 6 3

2-アミノ-2-メチルマロン酸ジエチル

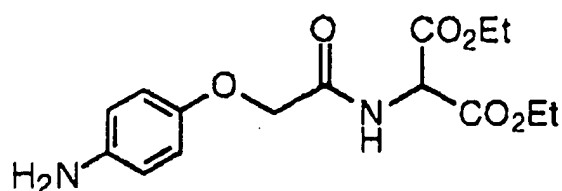


2-( $\alpha$ -ブトキシカルボニルアミノ)マロン酸ジエチル

(5.1ml) の THF (80ml) 溶液に室温下、60%水素化ナトリウム油性 (0.96g) を加え 30 分間攪拌した。ヨードメタン (1.5ml) を加えさらに 8 時間攪拌した。氷冷した 5%クエン酸水溶液に反応液をあけ、酢酸エチルにて抽出した。有機層を水、飽和食塩水の順に洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 酢酸エチル：ヘキサン = 1 : 10) にて精製した。2-( $\alpha$ -ブトキシカルボニルアミノ)-2-メチルマロン酸ジエチル (5.16g) を無色油状物として得た。得られた油状物 (5.16g) を 1 M 塩酸-酢酸エチル (80ml) に溶解し、室温にて 10 分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、有機層を分取した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、目的物 (2.70g) を無色油状物として得た。

### 参考例 6 4

(4-アミノフェニル)オキシアセチルアミノマロン酸ジエチル



(4-ニトロフェニル) オキシ酢酸 (0.92g) とアミノマロン酸ジエチル塩酸塩 (1.11g) を DMF (20ml) に溶解し、トリエチルアミン (0.72ml)、WSC (0.98g)、DMA P (0.06g) を加え、室温にて 9 時間攪拌した。反応液を水にあげ酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、希塩酸、水、飽和食塩水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をイソプロピルエーテルに懸濁後、ろ取り乾燥した。2-[(4-ニトロフェニル) オキシアセチルアミノ] マロン酸ジエチル (1.00g) を乳白色結晶として得た。融点 106-108°C

元素分析値 (%) :  $C_{15}H_{18}N_2O_8$  として

	C	H	N
計算値	50.85	5.12	7.91
実測値	50.57	5.02	8.05

上記ニトロ体 (0.67g) をエタノール (30ml) に溶解し、10% Pd/C (0.07g) を加え、水素雰囲気下室温にて 2.5 時間攪拌した。触媒をろ去後、溶媒を減圧留去し、目的物 (0.61g) を紫褐色粉末として得た。

### 実施例 1

トリエトキシカルボニルメチルアミン



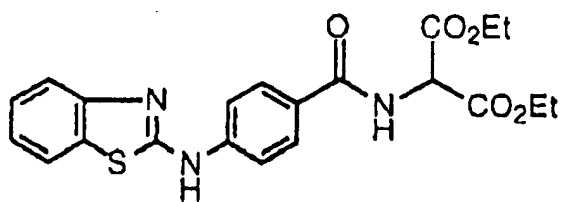


J. Org. Chem., 44, 4836 (1979) を参考にして以下のように合成した。  
60%水素化ナトリウム油性 (0.22g) の THF (7.5ml) 懸濁液に、  
トリエトキシカルボニルメタン (1.16g) の THF (7.5ml) 溶液を  
室温にて 10 分かけて滴下した。更に 10 分攪拌後、O- (2, 4-  
ジニトロフェニル) ヒドロキシアミン (1.00g) の THF (10ml)  
溶液を滴下した。室温にて一晩攪拌した後、溶媒を減圧留去し、残  
渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン：  
酢酸エチル = 2 : 1) にて精製し目的物 (0.80g) を黄色油状物とし  
て得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 1.33(9H, t,  $j=7.3\text{Hz}$ ) 4.34(6H, q,  $j=7.3\text{Hz}$ )  
5.05(2H, br).

## 実施例 2

[4- (ベンゾチアゾール-2-イルアミノ) ベンゾイルアミノ]  
マロン酸ジエチル



参考例 3 の化合物 (0.27g)、アミノマロン酸ジエチル塩酸塩 (0.23g)  
の DMF (10ml) 溶液に、トリエチルアミン (0.15ml)、WSC (0.29g)、  
DMA P (0.05g) を加え、18 時間室温にて攪拌した。反応液に水  
を加えた後、酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和炭酸水素ナト  
リウム水溶液、水、希塩酸、水、飽和食塩水の順に洗浄し、無水硫  
酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカ

ラムクロマトグラフィー（展開溶媒 酢酸エチル：n-ヘキサン＝1：1）で精製し、目的物（0.38g）を無色粉末として得た。融点 196-197°C

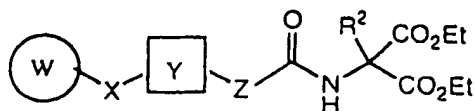
元素分析値（%）：C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>1</sub> / 5 H<sub>2</sub>Oとして

	C	H	N
計算値	58.51	5.00	9.75
実測値	58.52	4.87	9.92

### 実施例 3 - 6 7

参考例の化合物や実施例 1 の化合物を用いて、実施例 2 と同様に反応させ表 2 に示した化合物（実施例 3 - 6 3）を合成した。なお、実施例 6 4 - 6 7 は実施例 2 と同様に反応させた後、後処理の段階で抽出した有機層を希塩酸洗浄した時に析出した結晶をろ取したものである。

表 2



実施例	W	X	Y	Z	R <sup>2</sup>	融点 (°C) (再結晶溶媒)	元素分析値 計算値/実測値 C、H、N
3		NH		-CH <sub>2</sub> -	H	169-170.5 (AcOEt)	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 59.85, 5.25, 9.52 59.72, 5.16, 9.42
4		NH			H	205-206.5 (AcOEt)	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 60.91, 5.11, 9.27 60.88, 5.02, 9.22
5		NH		-NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	H	179-181	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S 57.82, 5.26, 11.24 57.90, 5.13, 11.28
6		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	156.5-158.0	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 57.76, 5.07, 9.18 57.77, 5.06, 9.26
7		NH		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	138.5-140.5	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 60.64, 5.53, 9.22 60.54, 5.50, 9.30
8		NH		(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	H	127-128	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 61.39, 5.80, 8.95 60.90, 5.72, 8.86
9		NH		CH <sub>2</sub>	H	173-176	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 58.59, 5.34, 8.91 58.39, 5.33, 8.88
10		NH		CH <sub>2</sub>	H	182.5-183.5	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 60.64, 5.53, 9.22 60.62, 5.48, 9.26
11		NH		CH <sub>2</sub>	H	181-183	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 60.64, 5.53, 9.22 60.53, 5.49, 9.28
12		NH		CH <sub>2</sub>	H	142.5-144.0	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 60.64, 5.53, 9.22 60.41, 5.48, 9.23
13		NH		CH <sub>2</sub>	H	158.0-159.5	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S HRMS 485.1621 485.1621
14		NH		CH <sub>2</sub>	H	164-166	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 54.22, 4.35, 8.25 54.05, 4.30, 8.29
15		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	124-125 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 55.57, 4.66, 8.84 55.82, 4.68, 8.99
16		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	131.5-133.0 (iPr <sub>2</sub> O-AcOEt)	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 53.71, 4.51, 8.54 53.51, 4.51, 8.63
17		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	156.0-157.5 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 58.59, 5.34, 8.91 58.44, 5.34, 8.70
18		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	164-165	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 55.57, 4.66, 8.84 55.51, 4.72, 8.65
19		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	179.0-180.5	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 53.71, 4.51, 8.54 53.79, 4.65, 8.27

実施例	W	X	Y	Z	R <sup>2</sup>	融点 (°C) (再結晶溶媒)	元素分析値 計算値/実測値 C, H, N
20		NH		-OCMe <sub>2</sub> -	H	amorphous	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S HRMS 519.1231 519.1234
21		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	163.5-165.0 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 50.20, 4.02, 7.98 50.08, 3.96, 7.89
22		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	155.5-157.0	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> 54.86, 5.00, 8.34 54.80, 4.96, 8.54
23		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	123.0-124.5 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S 56.66, 5.17, 8.62 56.75, 5.20, 8.69
24		NH		-OCMe <sub>2</sub> -	H	136.0-137.5 (iPr <sub>2</sub> O-hexane)	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S HRMS 515.1726 515.1709
25		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	170-171	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 58.59, 5.34, 8.91 58.42, 5.38, 8.83
26		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	188-190	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S 52.58, 4.41, 11.15 52.51, 4.40, 11.07
27		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	191.0-192.5	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S HRMS 514.1522 514.1531
28		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	185-187	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S 57.70, 5.04, 8.41 57.56, 5.03, 8.26
29		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	130-132 (iPr <sub>2</sub> O-AcOEt)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S 55.01, 4.84, 12.22 54.78, 4.85, 12.02
30		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	179-181 (iPr <sub>2</sub> O-AcOEt)	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 61.53, 4.96, 8.28 61.33, 4.96, 8.28
31		NH		—	H	153.0-154.5 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 59.61, 5.21, 8.69 59.63, 5.18, 8.66
32		NH		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	115-117 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 60.64, 5.53, 9.22 60.50, 5.48, 9.12
33		NH		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	157-157	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S 61.39, 5.80, 8.95 61.37, 5.98, 8.59
34		NH		-OCH <sub>2</sub> -	Me	154-155	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 58.59, 5.34, 8.91 58.59, 5.40, 8.66
35		NH		-OCH <sub>2</sub> -	CO <sub>2</sub> Et	amorphous	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S HRMS 529.1519 529.1478
36		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	159-162	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S HRMS 471.1464 471.1470

実施例	W	X	Y	Z	R <sup>2</sup>	融点 (°C) (再結晶溶媒)	元素分析値 計算値/実測値 C、H、N
37		NH		CH <sub>2</sub>	H	131.0-132.5 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S 50.87, 4.49, 12.49 50.83, 4.41, 12.74
38		-CONH-		-OCH <sub>2</sub> -	H	135.5-137.5	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 1/5H <sub>2</sub> O 61.16, 5.69, 6.48 61.22, 5.57, 6.45
39		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	95-96	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> 59.84, 5.78, 10.47 59.48, 5.72, 10.41
40		NH		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	135-136	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> 62.10, 6.88, 14.48 61.99, 6.84, 14.47
41		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	125-128	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> 59.37, 6.44, 14.42 59.29, 6.40, 14.87
42		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	156-157	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 51.07, 4.50, 11.91 50.89, 4.50, 12.26
43		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	160-162 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 52.07, 4.79, 11.57 52.04, 4.69, 11.73
44		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	125-126	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 50.40, 4.63, 11.20 50.38, 4.55, 11.11
45		NH		-OCH <sub>2</sub> -	Me	85-86	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 51.36, 4.90, 10.89 51.50, 4.78, 10.78
46		NH		-OCMe <sub>2</sub> -	H	131-133	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> HRMS 528.1832 528.1825
47		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	176-177	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 47.58, 3.99, 11.10 47.32, 3.87, 11.22
48		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	186-189	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> 46.61, 3.91, 13.59 46.62, 3.95, 13.59
49		NH			H	198-199	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> 54.08, 4.54, 12.01 54.15, 4.51, 12.14
50		NH		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	167-168	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> 53.85, 4.95, 11.96 53.86, 4.90, 11.99
51		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	131-133	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 60.78, 5.77, 12.33 60.41, 5.65, 12.04

実施例	W	X	Y	Z	R <sup>2</sup>	融点 (°C) (再結晶溶媒)	元素分析値 計算値/実測値 C、H、N
52		NH		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	amorphous	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> HRMS 452.2060 452.2055
53		NH			H	193(decomp.)	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S HRMS 494.4624 494.1624
54		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	155-157.5	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , 4/5H <sub>2</sub> O 58.77, 5.84, 10.97 58.57, 5.56, 10.92
55		NH		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	140-143	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> HRMS 494.2165 494.2165
56		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	112-113	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> 63.85, 5.58, 9.31 63.60, 5.51, 9.15
57		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	136-138 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> 64.50, 5.85, 9.03 64.64, 5.86, 9.18
58		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	114-115	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> 62.36, 5.65, 8.73 61.96, 5.61, 8.68
59		NH		-OCH <sub>2</sub> -	Me	123-124	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> 63.02, 5.90, 8.48 62.87, 5.94, 8.31
60		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	129.5-130.5 (iPr <sub>2</sub> O)	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> 59.32, 4.98, 8.65 58.96, 4.99, 8.57
61		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	158-160	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> 58.06, 4.87, 11.29 57.89, 4.80, 11.33
62		NH		-OCH <sub>2</sub> -	H	161.5-164.0	C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> 67.05, 5.43, 8.38 66.69, 5.42, 8.67
63		NH		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	105-106	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> 66.80, 6.05, 9.35 66.63, 6.00, 9.25
64		NH			H	190(decomp.)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> , HCl 59.03, 5.53, 10.59 58.79, 5.44, 10.54
65		NH			H	199(decomp.)	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> , HCl 60.48, 6.16, 12.59 60.29, 6.10, 12.65
66		NH			H	191(decomp.)	C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S, HCl, 1/2H <sub>2</sub> O 54.68, 5.82, 12.26 54.64, 5.79, 12.44
67		NH		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	147-150	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S, HCl, H <sub>2</sub> O 53.65, 6.23, 12.63 53.87, 5.95, 11.89

次に本発明化合物について、有用性を裏付ける成績を実験例によって示す。

ヒト血管内皮細胞とU937細胞（ヒト単球系細胞株）との接着に対する試験化合物の阻害効果

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞（H U V E C）をヒトインターロイキン-1（I L - 1）で刺激することによりI C A M - 1、V C A M - 1、E L A M - 1等の接着分子の発現が誘導される。刺激24時間後では、主にI C A M - 1、V C A M - 1の発現が認められる（J. Immunol. 144, 2558 (1990), *ibid*, 149, 698 (1992)）。I L - 1で24時間刺激したH U V E Cを用いて細胞接着試験を行うことで、I C A M - 1、V C A M - 1を介した接着反応を試験できる。さらに、試験化合物の添加時期を、I L - 1でH U V E Cを刺激する時と、H U V E CとU937との接着時とに分けることにより、試験化合物の接着阻害作用が主に接着分子の結合阻害によるのか、または接着分子の発現抑制によるものであるか評価できる。

#### 実験例 1 接着分子の結合阻害試験

20%ウシ胎児血清及び10 ng/ml血管内皮細胞増殖因子（E C G F）を含むM199培地（培養用）に浮遊したH U V E Cを、96穴コラーゲンコートプレート（平底）に $2 \times 10^4$ /ウェルずつ播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。約24時間培養後、ウシ胎児血清及びE C G Fを含まないM199培地（洗浄用）で、H U V E Cを2回洗浄した。次に、ヒトインターロイキン-1β（I L - 1β）を10 U/ml含む培養用M199培地で24時間培養した。一方、U937細胞浮遊液（ $1 \times 10^7$ /ml）1 mlあたりに1 mM B C E C F - A M溶液（和光純薬工業）を10 μlずつ加え、氷冷下で1時間インキュベートして蛍光標識した。蛍光標

識U937細胞を、リン酸緩衝生理食塩水（PBS（－））で2回洗浄後、10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640培地に浮遊した（ $1 \times 10^7 / \text{ml}$ ）。HUVECを洗浄用M199培地で3回洗浄した。試験化合物をジメチルスルホキシドに溶解し、さらに培養用M199培地で1000倍に希釈したものを $80 \mu\text{l} / \text{ウェル}$ ずつ添加した。続いて蛍光標識U937細胞浮遊液を $20 \mu\text{l} / \text{ウェル}$ ずつ添加した（試験化合物の最終濃度 $1.0 \mu\text{M}$ ）。毎分1000回転、室温、1分間遠心後、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 下で30分間培養した。各ウェルを、PBS（－） $100 \mu\text{l}$ で2回洗浄して、未接着細胞を除去した。0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液を $100 \mu\text{l} / \text{ウェル}$ ずつ添加して、細胞を可溶化した。各ウェルの蛍光強度を測定し（Excitation 490nm, Emission 530nm）、検量線から接着したU937細胞数を求めた。下式に従って、接着抑制率を算出した。

$$\text{接着抑制率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{試験化合物の接着細胞数} - \text{IL-1}\beta \text{ 非添加対照の接着細胞数}}{\text{IL-1}\beta \text{ 添加対照の接着細胞数} - \text{IL-1}\beta \text{ 非添加対照の接着細胞数}} \right) \times 100$$

結果を表3に示す。なお、100%を超える抑制率については100%として示した。

## 実験例2 接着分子の発現抑制試験

培養用M199培地に浮遊したHUVECを、96穴コラーゲンコートプレート（平底）に $2 \times 10^4 / \text{ウェル}$ ずつ播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 下で培養した。約24時間培養後、洗浄用M199培地



で、H U V E C を 2 回 洗 浄 した。試 験 化 合 物 を ジ メ チ ル ス ル ホ キ シ ド に 溶 解 し、さ ら に 培 養 用 M 1 9 9 培 地 で 1 0 0 0 倍 に 希 釈 し た も の を  $80 \mu\text{l}$  / ウ ェ ル ず つ 添 加 し、1 時 間 培 養 した。次 に、I L - 1  $\beta$  を 含 む 培 養 用 M 1 9 9 培 地 を  $20 \mu\text{l}$  / ウ ェ ル ず つ 添 加 し、2 4 時 間 培 養 した ( I L - 1  $\beta$  の 最 終 濃 度  $10 \text{ U} / \text{ml}$ 、試 験 化 合 物 の 最 終 濃 度  $10 \mu\text{M}$  ) 。 一 方、U 9 3 7 細 胞 浮 遊 液 (  $1 \times 10^7 / \text{ml}$  )  $1 \text{ ml}$  あ た り に  $1 \text{ mM}$  B C E C F - A M 溶 液 ( 和 光 純 薬 工 業 ) を  $10 \mu\text{l}$  ず つ 加 え、氷 冷 下 で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し て 蛍 光 標 識 した。蛍 光 標 識 U 9 3 7 細 胞 を、P B S ( - ) で 2 回 洗 浄 後、1 0 % ウ シ 胎 児 血 清 を 含 む R P M I - 1 6 4 0 培 地 に 浮 遊 した (  $1 \times 10^7 / \text{ml}$  ) 。 H U V E C を 洗 浄 用 M 1 9 9 培 地 で 3 回 洗 浄 した 後、培 養 用 M 1 9 9 培 地 を  $80 \mu\text{l}$  / ウ ェ ル 及 び 蛍 光 標 識 U 9 3 7 細 胞 浮 遊 液 を  $20 \mu\text{l}$  / ウ ェ ル 添 加 した。毎 分 1 0 0 0 回 転、室 温、1 分 間 遠 心 後、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  下 で 3 0 分 間 培 養 した。各 ウ ェ ル を、P B S ( - )  $100 \mu\text{l}$  で 2 回 洗 浄 し て、未 接 着 細 胞 を 除 去 した。0 . 1 % ド デ シ ル 硫 酸 ナ ト リ ウ ム 水 溶 液 を  $100 \mu\text{l}$  / ウ ェ ル ず つ 添 加 し て、細 胞 を 可 溶 化 した。各 ウ ェ ル の 蛍 光 強 度 を 測 定 し ( Excitation  $490\text{nm}$ , Emission  $530\text{nm}$  ) 、検 量 線 か ら 接 着 し た U 9 3 7 細 胞 数 を 求 め た。下 式 に 従 っ て、接 着 抑 制 率 を 算 出 した。

$$\text{接 着 抑 制 率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{試 験 化 合 物 の 接 着 細 胞 数} - \text{IL-1}\beta \text{ 非 添 加 対 照 の 接 着 細 胞 数}}{\text{IL-1}\beta \text{ 添 加 対 照 の 接 着 細 胞 数} - \text{IL-1}\beta \text{ 非 添 加 対 照 の 接 着 細 胞 数}} \right) \times 100$$

結 果 を 表 4 に 示 す。

表 3、接着分子の結合阻害試験

抑制率 (%)		抑制率 (%)	
実施例番号	10 $\mu$ M	実施例番号	10 $\mu$ M
6	87	40	78
7	88	44	88
8	75	45	95
11	69	46	87
13	65	48	51
22	75	58	60
23	100	60	51
24	79	63	75
31	57	66	65
34	74		

表 4 接着分子の発現抑制試験

抑制率 (%)		抑制率 (%)	
実施例番号	10 $\mu$ M	実施例番号	10 $\mu$ M
6	7	40	9
7	-9	44	11
8	-5	45	-9
11	-20	46	9
13	-4	48	0
22	7	58	13
23	-3	60	-14
24	5	63	12
31	7	66	6
34	9		

### 実験例 3 ラット遅延型過敏反応試験

ルイス系雌性ラット（日本チャールス・リバー）8または9週齢を、各群5匹に分けた。ラットの右後肢足蹠部皮内に、流動パラフィンに懸濁したマイコバクテリウム・ブチリカム死菌（ディフコ）0.6mg/0.05mlを注射した。7日後に、電動バリカンで背部の毛を刈り、ダイヤルシックネスゲージ（尾崎製作所）を用いて、背部の皮膚厚（左右2ヶ所）を測定した。次に、皮膚厚測定部に抗原液50 $\mu$ lを皮内注射した。抗原液としては、200 $\mu$ g/mlとなるようにマイコバクテリウム・ブチリカム死菌を生理食塩水に懸濁させ、毎分3000回転、4 $^{\circ}$ C、10分間遠心した上清を使用した。抗原液注射24時間後に注射部位の皮膚厚を測定し、皮膚厚増加量を求め、左右2ヶ所の平均を各固体のデータとした。試験化合物は、3%アラビアゴム水溶液に懸濁し、マイコバクテリウム・ブチリカム死菌注射日から7日後まで、1日1回、連日、ラットの体重100gあたり0.5mlずつ経口投与した。対照群には、3%アラビアゴム水溶液のみを投与した。結果を、対照群の皮膚厚増加量に対する試験化合物の皮膚厚増加量の百分率で表した。結果を表5に示す。

表5 遅延型過敏反応に対する効果

実施例番号	投与量 (mg/kg/day, p.o.)	n	皮膚厚増加量 の百分率 (%)
6	30	5	71**
7	30	5	80*
31	30	5	80*
44	30	5	63**
58	30	5	64**
66	30	5	72**
23	30	5	78*

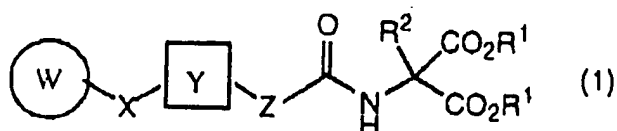
\*  $P < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  で有意差有り。

### 産業上の利用可能性

以上のように、一般式（１）で表される本発明化合物は、I C A M－１、V C A M－１等の細胞接着分子の発現抑制作用を示すことなく、これらが介する細胞間の結合を阻害し、なおかつ遅延型過敏反応試験においてもその有効性が認められた。

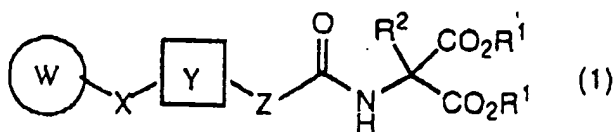
## 請求の範囲

## 1. 一般式 (1)



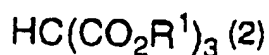
[式中、Wは置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいキノリン環、置換されていてもよいベンゾチアゾール環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいキナゾリン環、置換されていてもよいチエノピリミジン環、置換されていてもよいベンズイミダゾール環を、Xはアミノ基、 $-\text{CONH}-$ を、Yは置換されていてもよいベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、クロマン環、1,3-チアゾール環を、Zは $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$  ( $n$ は0~3の整数)を、 $\text{R}^1$ は炭素数1~4の低級アルキル基を、 $\text{R}^2$ は水素原子、炭素数1~4の低級アルキル基、炭素数1~4の低級アルコキシカルボニル基を示す]で表されることを特徴とするマロン酸ジエステル誘導体及び薬理学的に許容しうる塩。

## 2. 一般式 (1)

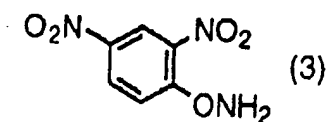


〔式中、Wは置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいキノリン環、置換されていてもよいベンゾチアゾール環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいキナゾリン環、置換されていてもよいチエノピリミジン環、置換されていてもよいベンズイミダゾール環を、Xはアミノ基、 $-\text{CONH}-$ を、Yは置換されていてもよいベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、クロマン環、1,3-チアゾール環を、Zは $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$  ( $n$ は0～3の整数)を、 $\text{R}^1$ は炭素数1～4の低級アルキル基を、 $\text{R}^2$ は水素原子、炭素数1～4の低級アルキル基、炭素数1～4の低級アルコキシカルボニル基を示す〕で表されることを特徴とするマロン酸ジエステル誘導体及び薬理学的に許容しうる塩の少なくとも一種類以上を有効成分とする細胞接着抑制剤。

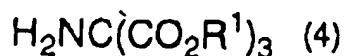
### 3. 一般式 (2)



〔式中、 $\text{R}^1$ は炭素数1～4の低級アルキル基を示す〕で表される化合物に、式 (3)

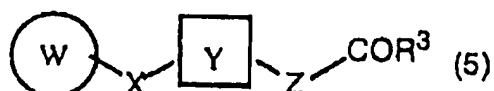


で表される化合物を反応させることを特徴とする一般式 (4)

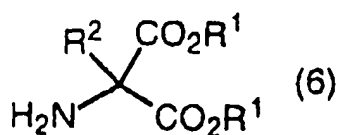


〔式中、 $\text{R}^1$ は前述の通り〕で表される化合物の製造方法。

#### 4. 一般式 (5)

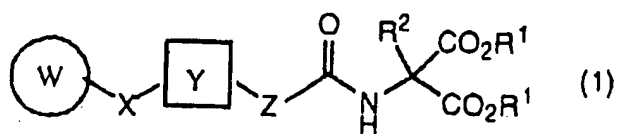


〔式中、 $\text{W}$ は置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいキノリン環、置換されていてもよいベンゾチアゾール環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいキナゾリン環、置換されていてもよいチエノピリミジン環、置換されていてもよいベンズイミダゾール環を、 $\text{X}$ はアミノ基、 $-\text{CONH}-$ を、 $\text{Y}$ は置換されていてもよいベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、クロマン環、1,3-チアゾール環を、 $\text{Z}$ は $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$  ( $n$ は0~3の整数)を、 $\text{R}^3$ はヒドロキシ基、ハロゲン原子を示す〕で表される化合物と、一般式 (6)



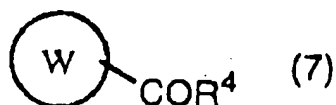
〔式中、 $\text{R}^1$ は炭素数1~4の低級アルキル基を、 $\text{R}^2$ は水素原子、炭素数1~4の低級アルキル基、炭素数1~4の低級アルコキシカ

ルボニル基を示す] で表される化合物を縮合させることを特徴とする一般式 (1)

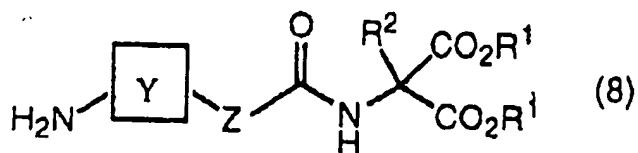


[式中、W、X、Y、Z、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は前述の通り] で表される化合物の製造方法。

#### 5. 一般式 (7)

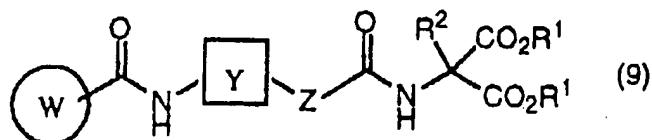


[式中、Wは置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいキノリン環、置換されていてもよいベンゾチアゾール環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいキナゾリン環、置換されていてもよいチエノピリミジン環、置換されていてもよいベンズイミダゾール環を、R<sup>4</sup>はヒドロキシ基、ハロゲン原子を示す] で表される化合物と、一般式 (8)





[式中、Yは置換されていてもよいベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、クロマン環、1,3-チアゾール環を、Zは $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$  (nは0～3の整数)を、 $\text{R}^1$ は炭素数1～4の低級アルキル基を、 $\text{R}^2$ は水素原子、炭素数1～4の低級アルキル基、炭素数1～4の低級アルコキシカルボニル基を示す]で表される化合物を縮合させることを特徴とする一般式(9)



[式中、W、Y、Z、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ は前述の通り]で表される化合物の製造方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04914

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>6</sup> C07C235/20, 227/06, 229/24, 231/02, C07D213/38, 215/38, 235/30, 239/42, 239/47, 239/48, 239/94, 277/42, C07D277/44, 277/68, 277/82, 333/54, 417/12, A61K31/225, 31/38, 31/415, 31/425, 31/44, 31/47, 31/505  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>6</sup> C07C235/20, 227/06, 229/24, 231/02, C07D213/38, 215/38, 235/30, 239/42, 239/47, 239/48, 239/94, 277/42, C07D277/44, 277/68, 277/82, 333/54, 417/12, A61K31/225, 31/38, 31/415, 31/425, 31/44, 31/47, 31/505

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 48-36199, A (The Upjohn Company), 28 May, 1973 (28.05.73), Claim 1 & DE, 2242918, A & NL, 7212455, A & FR, 2154511, A	3
A	SANFILIPPO, P. J. et al "Novel Thiazole Based Heterocycles as Inhibitors of LFA-1/ICAM-1 Mediated Cell Adhesion", J. Med. Chem., Vol. 38, No. 7 (1995), Pages 1057-1059	1, 2, 4, 5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 November, 1999 (22.11.99)

Date of mailing of the international search report  
30 November, 1999 (30.11.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04914

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims (1, 2, 4 and 5) relate to compounds represented by the formula (1), while invention as set forth in claim 3 relates to a process for producing compounds represented by the formula (4). It is therefore obvious that these two groups of inventions have no matter in common. Such being the case, these two groups of inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive step.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>8</sup> C07C235/20, 227/06, 229/24, 231/02, C07D213/38, 215/38, 235/30, 239/42, 239/47, 239/48, 239/94, 277/42, C07D277/44, 277/68, 277/82, 333/54, 417/12, A61K31/225, 31/38, 31/415, 31/425, 31/44, 31/47, 31/505

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>8</sup> C07C235/20, 227/06, 229/24, 231/02, C07D213/38, 215/38, 235/30, 239/42, 239/47, 239/48, 239/94, 277/42, C07D277/44, 277/68, 277/82, 333/54, 417/12, A61K31/225, 31/38, 31/415, 31/425, 31/44, 31/47, 31/505

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 48-36199, A (ザ・アップジョン・カンパニー) 28. 5月. 1973 (28. 05. 73) 請求項1 &DE, 2242918, A &NL, 7212455, A &FR, 2154511, A	3
A	SANFILIPPO, P. J. et al. "Novel Thiazole Based Heterocycles as Inhibitors of LFA-1/ICAM-1 Mediated Cell Adhesion" J. Med. Chem., Vol. 38, No. 7 (1995) p. 1057-1059	1, 2, 4, 5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

爾見 武志

4 H 9547

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 (1, 2, 4, 5) に記載された発明は、式(1)で表される化合物に関するものであり、請求の範囲3に記載された発明は、式(4)で表される化合物を製造する方法に関するものであって、明らかに両者に共通する事項はない。よって、これら2発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとはいえない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。